

ESTUDIO HISTOLOGICO DEL HEPATOPANCREAS DE *MELANOPSIS DUFOURI*.

HISTOLOGICAL STUDIES ON THE MIDGUT GLAND OF *MELANOPSIS DUFOURI*.

M.R. Rubio, P. Tineo y A. Pujante*

Palabras Clave: Hepatopáncreas, Gasterópodos, *Melanopsis*; ultraestructura.

Key Words: Hepatopancreas, midgut gland, Gastropods; *Melanopsis*; ultrastructure.

RESUMEN

Melanopsis dufouri, uno de los Gasterópodos dulceacuícolas más abundantes en el País Valencià está considerado como un excelente indicador de la calidad de las aguas. Dado que el hepatopáncreas de Moluscos y Crustáceos está reconocido como un órgano directamente implicado en el metabolismo de xenobióticos, se pretende en este trabajo el estudio previo de las características ultraestructurales de los distintos tipos celulares hepatopancreáticos con el fin de seleccionar entre ellos un modelo experimental que permita la demostración de la presencia/ausencia de metales pesados en los hábitats frecuentados por esta especie. Tras un estudio ultraestructural e interpretación de las funciones de cada uno de los cuatro tipos celulares, se proponen las células acumuladoras de calcio como elemento más propicio para el seguimiento de la acumulación de metales pesados.

ABSTRACT

Melanopsis dufouri, one of the more frequent freshwater Gastropods in País Valencià, is considered as a good indicator for water quality. The hepatopancreas (midgut gland) of Molluscan and Crustacean is known as an organ directly implied in the xenobiotic metabolism; so, this work intends the study of the ultrastructure of the different hepatopancreatic cell types, in order to determinate the most suitable experimental model to demonstrate the presence/absence of heavy metals in habitats occupied by the studied species. The ultrastructural study and functional interpretation show that the calcium containing cell is the preferent cell type to study the heavy metal accumulation in Molluscan.

INTRODUCCION

El primer trabajo significativo sobre *Melanopsis* fue el de GERMAIN (1921). Años más tarde se realizaron estudios sistemáticos sobre este género

y en los últimos años se han realizado estudios sobre la anatomía funcional de las partes blandas de algunas especies de *Melanopsis*. En el presente trabajo se lleva a cabo un estudio histológico del hepatopáncreas de *Melanopsis dufouri*. Se ha ele-

* Departament de Biologia Animal. Facultat de Biològiques. Universitat de València. 46100-Burjassot. València.

gido esta especie por ser uno de los moluscos dulceacuícolas más abundantes del País Valencià, así como por estar considerado un excelente indicador de la calidad de las aguas. De este modo, en futuros trabajos se pretenderá hacer un estudio del nivel de presencia de metales pesados en medios dulceacuícolas habitados por *Melanopsis dufouri*. Previo a estos estudios, es preciso conocer la estructura normal de ciertos órganos relacionados con el metabolismo de xenobióticos y concretamente de metales pesados. Este es el caso del hepatopáncreas, directamente implicado en este tipo de metabolismo. Según ésto, el objetivo principal de este trabajo es llegar a identificar y describir las características ultraestructurales de los distintos tipos celulares hepatopancreáticos de *Melanopsis dufouri*.

MATERIAL Y METODOS

Fragmentos de hepatopáncreas de *Melanopsis dufouri* han sido fijados en solución de Karnowsky (glutaraldehído 1%, paraformaldehído 2% en tampón Sörensen 0,15M, pH 7,2) durante dos horas a 4°C. La postfijación se ha realizado en tetróxido de osmio 1% en el mismo tampón, por un periodo de dos horas a 4°C. Tras deshidratación en soluciones de acetona de concentración creciente, se ha procedido a la inclusión de las muestras en araldita (Durcupan ACM). Los bloques se han seccionado en un ultramicrotomo JEOL-JUM7. Las secciones semifinas obtenidas se han teñido con azul de toluidina. Las secciones ultrafinas han sido contrastadas con citrato de plomo (REYNOLDS, 1963). El estudio ultraestructural de las muestras se ha realizado en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-800.

RESULTADOS

El hepatopáncreas de *Melanopsis dufouri*, al igual que el del resto de Moluscos, está constituido por una gran cantidad de túbulos ciegos tapizados por un epitelio pseudoestratificado en el que no todas sus células alcanzan la luz tubular. Hasta

cuatro tipos celulares constituyen la pared de los tubos, aunque su proporción relativa es distinta; según la nomenclatura al uso las denominaremos células secretoras, células absorbentes, células del calcio y células indiferenciadas.

Los tres primeros tipos son los más abundantes, mientras que una pequeña proporción de células indiferenciadas se ubica en el extremo distal de cada túbulo. Cada uno de estos está rodeado externamente por una fina capa de tejido conjuntivo, conteniendo algunas fibras musculares, que los mantiene unidos entre si dando consistencia al órgano en su conjunto.

Células secretoras (fig. 1): Morfología prismática. Citoplasma con numerosas vacuolas de contenido débilmente acidófilo y tamaño elevado, conteniendo el producto elaborado por la célula; matriz citoplasmática reducida a una trama esponjosa entre las vesículas que se tiñe débilmente por colorantes básicos. Núcleo esférico con nucleolo evidente y pequeña cantidad de heterocromatina de disposición granular; su ubicación es aproximadamente central sobre una porción más rica en citoplasma. La característica ultraestructural más aparente es la presencia de un retículo endoplásmico rugoso muy abundante, así como la baja densidad del contenido vesicular (fig. 8).

Células absorbentes (fig. 2): Célula también de citoplasma vacuolado, aunque el tamaño de las vesículas es más reducido y uniforme que en el caso anterior, apareciendo sin coloración su contenido. El núcleo muestra un contorno irregular, adaptado al espacio entre las vacuolas; se localiza en la porción central de la célula, con una coloración intensa de su matriz, un nucleolo de gran tamaño y escasa cantidad de heterocromatina. A nivel ultraestructural, cabe destacar la presencia de un borde en cepillo muy desarrollado a nivel apical, así como numerosos sáculos de retículo endoplásmico liso y mitocondrias en el citoplasma subapical (fig. 4); puede apreciarse también la presencia de lisosomas de gran tamaño y contenido de elevada densidad (fig. 6).

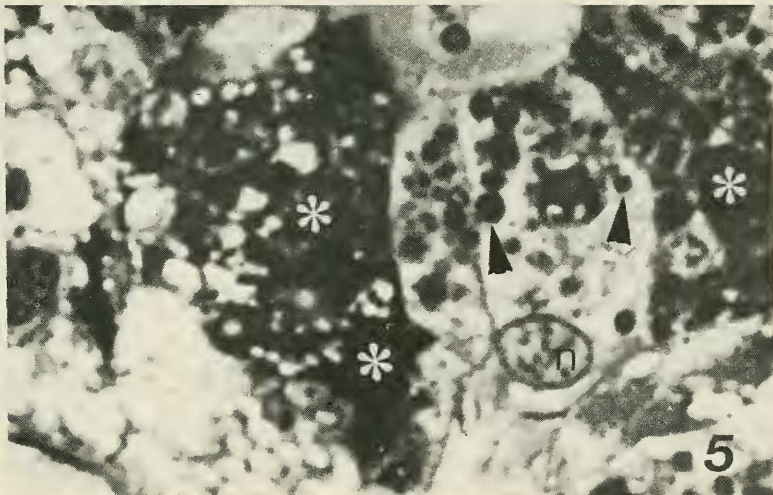
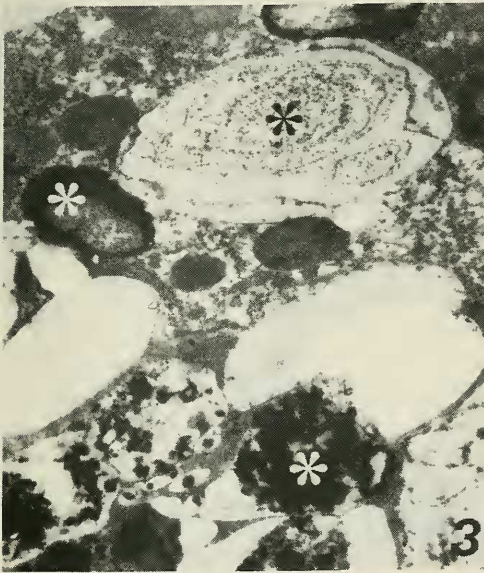
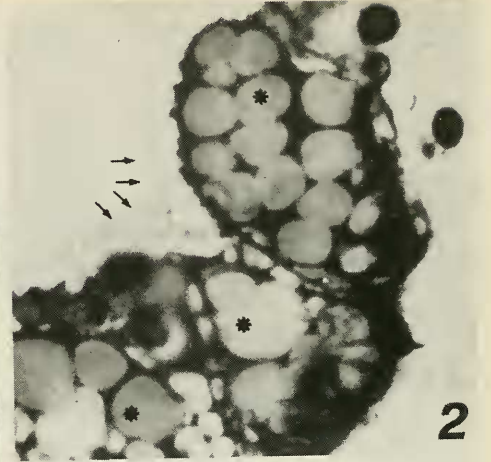
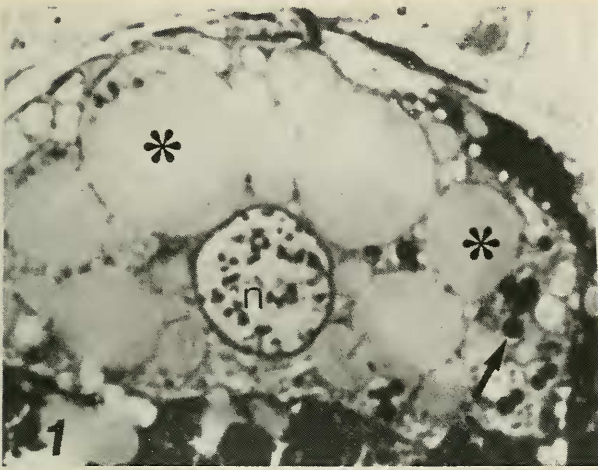
Fig. 1. Célula absorbente. Detalle de núcleo (n) y granulaciones (asterisco). 1000 X.

Fig. 2. Célula absorbente. Vesículas de contenido claro (asterisco) y borde en cepillo (flechas). 1000 X.

Fig. 3. Célula acumuladora de cationes. Gránulos en diversos estados de maduración (asterisco). 15000 X.

Fig. 4. Célula absorbente. Citoplasma apical con microvellosidades (mv) y retículo endoplásmico liso (flechas). 20000 X.

Fig. 5. Célula secretora. Granulaciones de tamaño uniforme (puntas de flecha); núcleo (n). Células acumuladoras de calcio (asterisco) con granulaciones de tamaño variable. 1000 X.



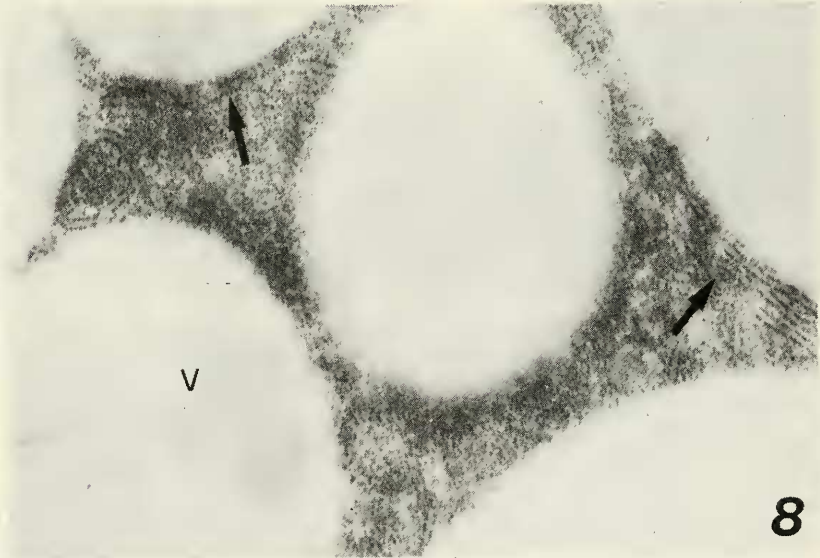
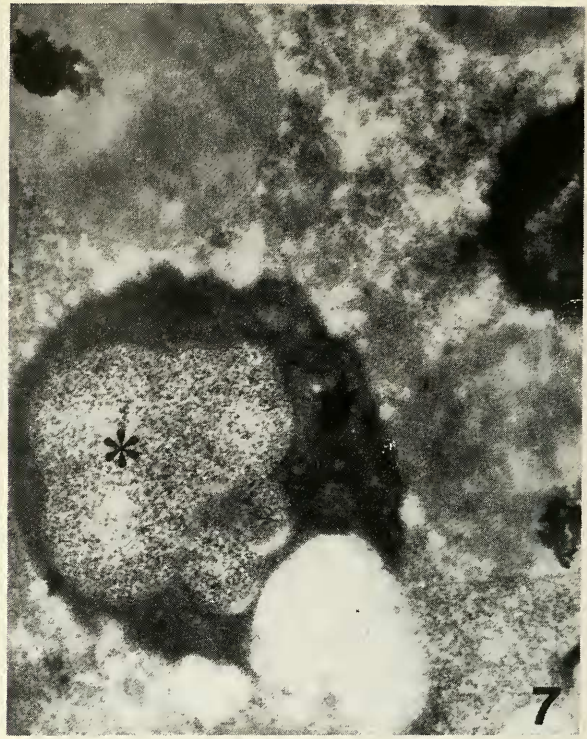
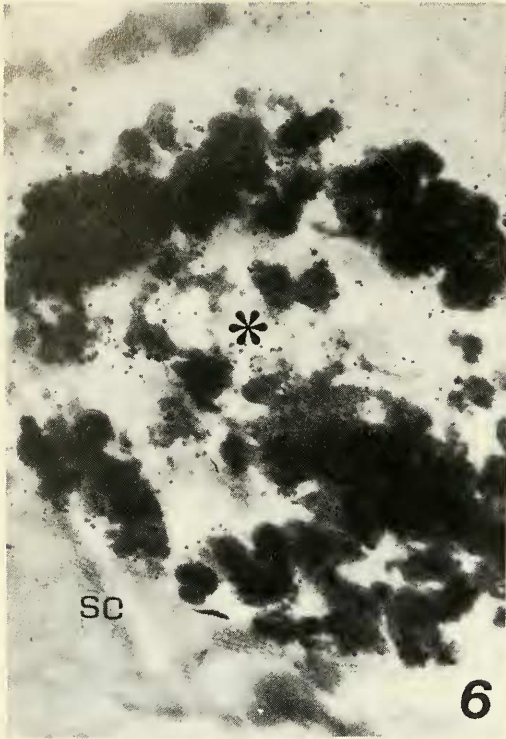


Fig. 6. Célula absorbente. Lisosoma (asterisco). Célula secretora (SC). 15000 X.

Fig. 7. Célula acumuladora de cationes. Gránulo maduro (asterisco). 25000 X.

Fig. 8. Célula secretora. Vesículas de contenido claro (v) y retículo endoplásmico ribosómico (flechas). 20000 X.

Células del calcio (fig. 5): morfología irregular, aunque ocupando la totalidad del espesor del epitelio, intercalándose entre los dos tipos celulares descritos anteriormente. Citoplasma acidófilo conteniendo gran número de partículas esféricas intensamente basófilas y centro refringente, de tamaño variable, aunque en general reducido. Núcleo denso, de contorno irregular y nucleolo bien desarrollado. Al microscopio electrónico, las vesículas presentan una elevada heterogeneidad en cuanto a estructura, pareciendo depender ésta del estado de maduración del contenido granular. En los gránulos que consideramos maduros, existen dos zonas claramente diferenciadas: una externa de elevada densidad al paso de los electrones, y otra central de densidad inferior y textura granular (fig. 7). Las granulaciones inmaduras presentan una estructura de baja densidad constituida por sistemas de membrana dispuestos en capas concéntricas (fig. 3).

Células indiferenciadas: Morfología ovalada, presentando escasos orgánulos, a excepción de ribosomas, mitocondrias y algún sáculo de retículo endoplásmico rugoso; el núcleo apenas presenta heterocromatina, siendo el nucleolo de gran tamaño, y numerosos los poros en la envoltura nuclear.

DISCUSION

La glándula digestiva de los Gasterópodos es considerada como el principal lugar de síntesis y secreción de enzimas digestivos, así como de absorción y almacenamiento (NAKAZIMA, 1956; OWEN, 1966). En el epitelio hepatopancreático de *M. dufouri* se presentan cuatro tipos celulares diferentes: células secretoras, absorbentes, acumuladoras de calcio e indiferenciadas. Las células secretoras sugieren por su ultraestructura una importante síntesis y acumulación de proteínas. En células secretoras de *Deroceras* (BABULA y SKOWRONSKA-WENLAND, 1988 a,b) y *Helix* (ROSENBAUM y DITZION, 1963) se ha demostrado histoquímicamente la existencia de fosfatasa ácida y esterases inespecíficas en el interior de las vesículas citoplasmáticas, lo cual corrobora la hipótesis de síntesis de enzimas hidrolíticos por parte de estas células, que posteriormente serían liberados a la luz tubular (KRYSZTOFIK, GLINIECKA y BIELAWSKI, 1983).

La presencia de numerosas microvellosidades en el borde apical de las células absorbentes, junto

con la presencia de perfiles de retículo endoplásmico liso y mitocondrias en el citoplasma subapical sugiere un importante transporte desde la luz tubular al interior del citoplasma con la posterior acumulación en vesículas del material transportado (ORIVE, BERJON y OTERO, 1979). La presencia a nivel apical de actividad fosfatasa alcalina (BABULA y SKOWRONSKA-WENLAND, 1988 a), enzima directamente implicado en el transporte transmembrana, en este tipo celular corrobora la hipótesis. De otro lado la presencia de numerosos lisosomas implica procesos de digestión intracelular del material absorbido, completándose así la digestión extracelular que tiene lugar en la luz tubular (NAKAZIMA, 1956).

Poca es la información existente sobre las células indiferenciadas, fácilmente identificables por su ultraestructura. Sin embargo, su escasez y disposición en las proximidades del extremo ciego de los túbulos hepatopancreáticos sugieren un proceso de renovación de los restantes tipos celulares semejante al que tiene lugar en las criptas de las vellosidades intestinales de Mamíferos.

En las células del calcio, nombre que hemos dado a este tipo celular ateniéndonos a la nomenclatura clásica, y más concretamente en el interior de sus granulaciones, se ha demostrado además de calcio, otros cationes (DURFORT, 1982; ABOLINS-KROGIS, 1970) incluyendo hierro, cadmio y zinc (IRELAND, 1982), siendo además estas vesículas o litosomas (ANDRE y FAURE-FREMIET, 1967) los lugares de acumulación de metales pesados tras exposición experimental en Pulmonados (IRELAND, 1982) y Prosobranchios (MARIGOMEZ, CAJARAVILLE y ANGULO, 1990). Por otro lado la existencia de fosfatasa ácida en los litosomas de este tipo celular (BOWEN, 1970) sugiere que este enzima está conectado con la acumulación y liberación de calcio (y otros cationes) desde la glándula digestiva de Gasterópodos. Por último, este tipo celular, acumulador de cationes, parece especialmente indicado para demostrar mediante estudios ultraestructurales, histoquímicos y de microanálisis, la presencia o no de metales pesados en el ambiente habitual de *M. dufouri*; previamente se requiere la aplicación de la misma metodología a individuos de esta especie expuestos experimentalmente a diversos metales pesados.

Trabajo parcialmente subvencionado por la DGICYT. Proyecto PB880349.

BIBLIOGRAFIA

- ABOLINS-KROGIS, A. 1970. Electron microscope studies of the intracellular origin and formation of calcifying granules and calcium spherites in the hepatopancreas of the snail *Helix pomatia* (L.). *Z. Zellforsch.*, 108:501-515.
- ANDRE, J. y FAURE-FREMIET, E. 1967. Formation et structure des concrétions calcaires chez *Prorodon morgani*, Kahl. *J. Microsc.* 6: 391-398.
- BABULA, A. y SKOWRONSKA-WENDLAND, D. 1988. Histological and histochemical studies of the digestive system of the slug *Deroceras reticulatus* (Müller) (Pulmonata). *Bull. Soc. Amis Sci. Lett. Poznan.*, 26: 65-71.
- BOWEN, I.D. 1970. The fine structural localization of acid phosphatase in the gut epithelial cells of the slug, *Arion ater* (L.). *Protoplasma*, 70: 242-260.
- DURFORT, M. 1982. Las concreciones minerales del hepatopáncreas de *Trachydermon cinereus*, Thiele (Mollusca, Poliplacophora). Estudio ultraestructural. *Iberus*, 2: 1-17.
- GERMAIN, L. 1921. *Mollusques terrestres et fluviatiles de Syrie*. Vols. 1 y 2. Baillièere et fills. Paris.
- IRELAND, M.P. 1982. Sites of water, zinc and calcium uptake and distribution of these metals after cadmium administration in *Arion ater* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.*, 73: 217-221.
- KRYSZTOFIK, J., GLINIECKA, M. y BIELAWSKI, J. 1983. Soluble phosphatases in the hepatopancreas of the hibernating snail *Helix pomatia*, L. (Pulmonata). *Bull. Soc. Amis Sci. Lett. Poznan*, 23:37-43.
- MARIGOMEZ, J.A.; CAJARAVILLE, M.P. y ANGULO, E. 1990. Cellular cadmium distribution in the common winkler, *Littorina littorea*, (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochem.*, 94: 191-199.
- NAKAZIMA, M. 1956. On the structure and function of the midgut gland of the Mollusca, with a general consideration of the feeding habits and systematic relations. *Jap. J. Zool.*, 11: 469-566.
- ORIVE, E., BERJON, A. y OTERO, M.P.F. 1979. A comparative study of intestinal absorption in *Arion empiricorum* and *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 64: 557-563.
- OWEN, G. 1966. Digestion. In: *Physiology of Mollusca*. (Eds. Wilbur, K.M. and Yonge, C.M.). Vol. II, pp. 53-96. Acad. Press. New York.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- ROSENBAUM, R.M. y DITZION, B. 1963. Enzymic histochemistry of granular components in digestive gland cells of the Roman snail *Helix pomatia*. *Biol. Bull.*, 124: 211-224.